



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 01 090 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 M 1/26
C 12 M 1/12
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/24
C 12 N 1/06

⑲ Aktenzeichen: 198 01 090.7
⑳ Anmeldetag: 14. 1. 98
㉑ Offenlegungstag: 15. 7. 99

DE 198 01 090 A 1

⑦① Anmelder:
Haase, Gerhard, 52134 Herzogenrath, DE; Bales,
Uwe, 52074 Aachen, DE; Schnitzler, Norbert, 52353
Düren, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE	27 47 496 C2
US	42 12 948
EP	01 22 581 A3
EP	01 22 581 A2
WO	94 00 557 A1
WO	90 13 624 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Lysis-Filtrations-Assay LYFA

DE 198 01 090 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Zur Isolierung von Mikroorganismen aus Flüssigkeiten werden verschiedene Verfahren eingesetzt. US-Patent Nr. 4.212.948 (hergestellt von Whampole Laboratories, Cranbury, NJ, USA als Isolator® 10) zeigt beispielsweise ein System, in welchem durch eine Lyse von Blutzellen von diesen vorher aufgenommene Mikroorganismen freigesetzt werden, die dann anschließend kulturell nachgewiesen werden können. Andere Verfahren stellen mikrobielles Wachstum in Flüssigkulturen aufgrund von Stoffwechselaktivitäten automatisch über entsprechende Indikatorsysteme fest (z. B. BacT/Alert®, Organon Teknika Corporation, Eppelheim, Deutschland).

Nachteile der bisherigen Verfahren sind zum einen die fehlende Trennung der Mikroorganismen von Blutzell-Trümmern oder im Verfahren angewandten Substanzen (z. B. US-Pat. Nr. 4.212.948), welche sich besonders bei einem anschließenden molekularbiologischen Nachweisverfahren wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) störend auswirken, bzw. zum anderen die langen Kulturzeiten und damit verbundenen langen Nachweiszeiten beim automatisierten oder konventionellen kulturellen Nachweisverfahren.

Aufgabe der Erfindung ist eine schnelle und einfache Isolierung von Mikroorganismen aus zellhaltigen Flüssigkeiten.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Die Lyse von Zellen, welche Mikroorganismen enthalten können, ist ein äußerst sensitives Verfahren zum Nachweis dieser Mikroorganismen in zellhaltigen und flüssigen Proben (z. B. Blut). Die Art und Weise der beschriebenen Lyse ermöglicht eine anschließende Filtration dieser zellhaltigen Probenflüssigkeit, und die beschriebene Filtrationsprozedur gewährleistet eine sehr hohe Rückhaltequote der nachzuweisenden Mikroorganismen.

Fakultativ kann der Nachweis von abfiltrierten Mikroorganismen unmittelbar nach der Filtration durch mikroskopische Betrachtung des Filters ggf. nach vorheriger Anfärbung erfolgen. Dies stellt damit eine extreme zeitliche Beschleunigung des Nachweises dar, welche angesichts der lebensbedrohlichen Erkrankung von entscheidender Bedeutung für die Therapie des Patienten ist. Diese Filter können nach der Mikroskopie auch weiter für molekulargenetische bzw. kulturelle Nachweisverfahren benutzt werden.

Die beschriebene Prozedur beeinträchtigt nicht die Lebensfähigkeit und somit auch nicht die Kultivierbarkeit der nachzuweisenden Mikroorganismen. Die so isolierten und anschließend kulturell angezüchteten Mikroorganismen können dann mittels etablierter Standardverfahren identifiziert und bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika getestet werden. Der besondere Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht dabei in der nahezu vollständigen Entfernung aller bei diesen Nachweisverfahren störenden Stoffen (z. B. Blutzelldebris, welcher das Koloniewachstum maskiert; antimikrobielle Substanzen aus der Probenflüssigkeit, die das Wachstum unterdrücken). Außerdem wird dadurch die unmittelbare Verwendung der kultivierten Mikroorganismen für Identifikationsverfahren (z. B. Gaschromatographie, molekulargenetische Identifizierung mittels speziesspezifischer Gensondenhybridisierung) ermöglicht, die ansonsten nur nach einer weiteren Subkultivierung der Mikroorganismen (wegen der dadurch sich ergebenden Entfernung von störenden Begleitsubstanzen) dafür eingesetzt werden können. Dies resultiert in einer zeitli-

chen Beschleunigung der Diagnostik.

Alternativ zu dem konventionellen kulturellen Nachweisverfahren können die mit der beschriebenen Prozedur abfiltrierten Mikroorganismen auch direkt (d. h. ohne vorherige kulturelle Vermehrung) auf dem Filter mittels moderner molekularbiologischer Nachweisverfahren (z. B. mittels markierter Antikörper) oder entsprechender molekulargenetischer Nachweisverfahren (z. B. mittels Gensondenhybridisierung) ggf. nach vorheriger in-vitro Amplifikation (z. B. mittels PCR) sichtbar gemacht werden und auch identifiziert werden. Der besondere Vorteil des beschriebenen Verfahrens besteht dabei wiederum in der nahezu vollständigen Entfernung aller bei diesen Nachweisverfahren störenden Stoffen (z. B. Hämoglobin bei der PCR u. LCR [Ligase-Kettenreaktion]). Dies ist ansonsten nur durch aufwendige Prozeduren zu bewerkstelligen, die immer mit einem Verlust von Mikroorganismen einhergehen und deshalb die Nachweisempfindlichkeit herabsetzen.

Es ist bei der beschriebenen Prozedur von Vorteil, daß die Isolierung von nachzuweisenden Mikroorganismen sehr schnell, sensitiv und preiswert (u. a. durch Verwendung von Standard-Probeentnahme-Systemen) durchgeführt werden kann.

Beispielbeschreibung zur Patentanmeldung

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher beschrieben.

Fig. 1 Probe mit Patientenblut in einem Standard-Blutentnahme-Röhrchen. (Beispielsweise 4 ml S-Monovette KE®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).

Fig. 2 Vorgelöstes Reagenz zum Lysieren von Blutzellen wird mittels einer kleinen Spritze (a: Vol. ca. 1 ml) über zwei Adapter (b1: Multi-Adapter, Sarstedt; b2: Luer-Lock weibl. / Luer-Lock weibl. Adapter, Rometsch GmbH, Heilbronn, Deutschland) der Blutprobe zugefügt. Durch die beiden zwischengeschalteten Adapter erreicht man eine Zugabe des Reagenzes in einem geschlossenen System und gewährleistet damit eine kontaminationsfreie Bearbeitung der Untersuchungsprobe.

Fig. 3 Über die bereits beschriebenen Adapter (**Fig. 2**: b1, b2) wird die dann durch das hinzugefügte Lysereagenz lytierte Blutprobe in eine größere Spritze (c: Volumen 20 ml oder größer) überführt, in welcher sich bereits eine Elektrolyt-Lösung (d) befindet. Diese dient zur Vorverdünnung der lysierten Blutprobe und erleichtert die anschließende Filtration.

Fig. 4 Auf die beschriebene großvolumige Spritze (**Fig. 3**: c), welche die lysierte und vorverdünnte Blutprobe enthält, ist ein Spritzenfilterhalter (e: beispielsweise aus V4A-Stahl, 13 mm Durchmesser, Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland) mit darin vorher steril eingesetztem Filter (beispielsweise Polycarbonat-Membran, 13 mm Durchmesser, Costar GmbH) aufgesetzt.

Fig. 5 Metallscheibe mit rasterartig angeordneten Bohrungen, welche bei der Filtration als Unterstützungsscheibe unter der Filterscheibe liegt. Dadurch sammelt sich strömungsbedingt mehr abfiltriertes Material (z. B. nachzuweisende Mikroorganismen, zugesetzter Farbstoff) dort auf der Filterscheibe an, wo sich die Bohrungen der Unterstützungsscheibe befinden. Auf diese Weise wird auf der Filterscheibe eine dem Lochmuster der Unterstützungsscheibe korrespondierende rasterartige Orientierungshilfe (Farbstoff) erzeugt, die z. B. eine mikroskopische oder fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Filterscheibe ggf. unter Zuhilfenahme von automatisierten Bilderkennungsvorrichtungen stark erleichtert.

Fig. 6 Filterscheibe mit rasterartig angeordnetem abfil-

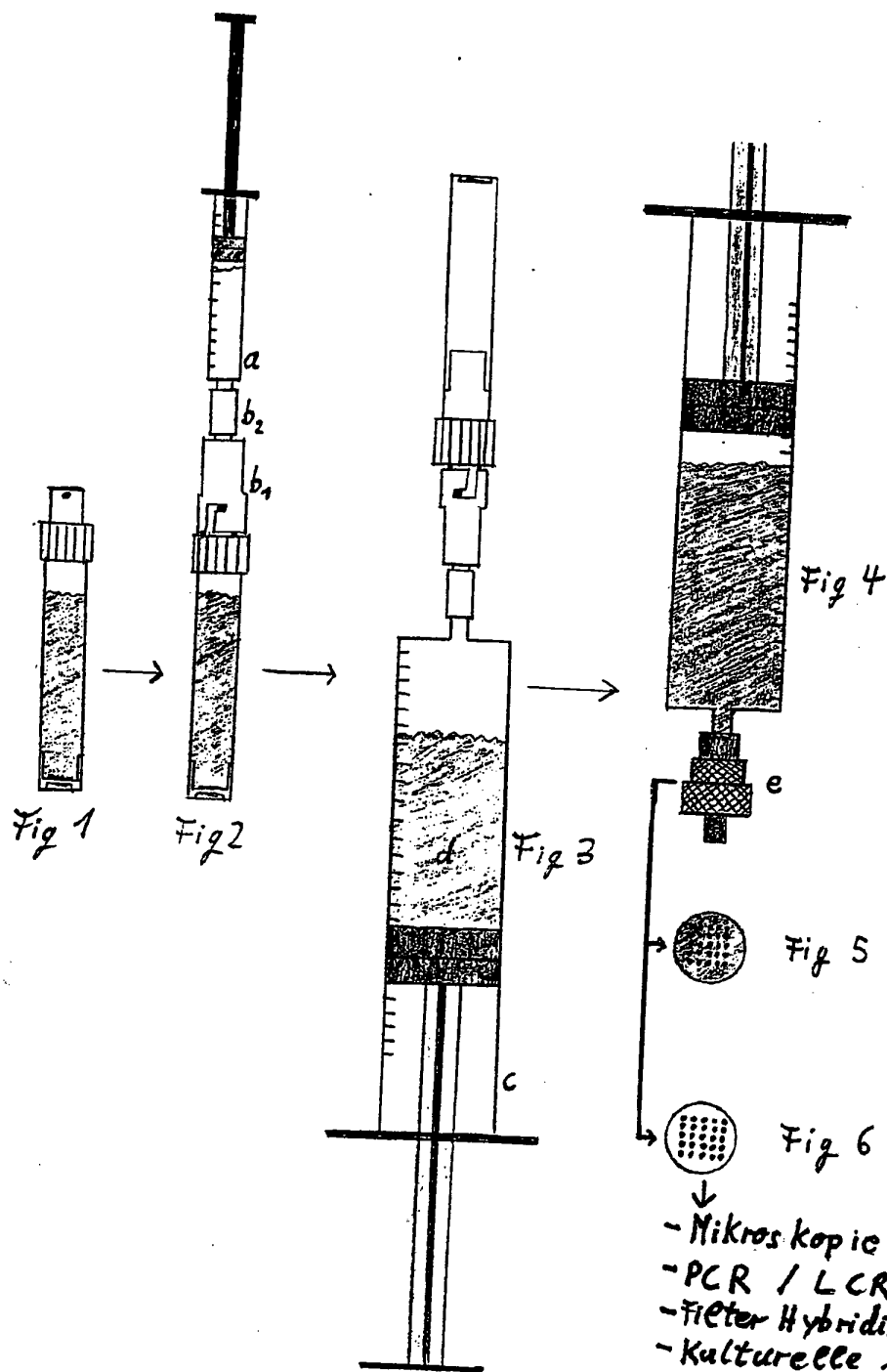
triertem Material aus einer lysierten Blutprobe. Diese Filterscheibe kann nun mikroskopisch betrachtet werden und/oder sie kann molekularbiologischen Nachweisverfahren zugeführt werden (z. B. in situ Hybridisierung ggf. nach vorhergehender in-vitro Amplifikation (PCR, LCR)). Weiterhin können aus der Blutprobe abfiltrierte Mikroorganismen auf dem Filter kulturell angezüchtet werden. So gewonnenes Zellmaterial der Mikroorganismen kann der gaschromatographischen oder konventionellen Spezies-Bestimmung zugeführt werden. Außerdem kann die Empfindlichkeit der angezüchteten Mikroorganismen gegenüber Antibiotika bestimmt werden.

haltigen Probeflüssigkeit ermöglicht.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Isolieren von Mikroorganismen aus zellhaltigen Flüssigkeiten, wie z. B. Blut, dadurch gekennzeichnet, daß Proben der Flüssigkeit in Standard-Entnahme-Systeme (z. B. S-Monovetten® KE, Sarstedt) entnommen werden können.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Zellen in der Flüssigkeit zunächst lysiert werden und die dadurch aus ihnen freigesetzten bzw. sich frei in der Flüssigkeit befindlichen Mikroorganismen anschließend durch Filtration isoliert werden.
3. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Reagenz zur Durchführung der Lyse ein Detergenz, z. B. 3-(3-Cholomido-propyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat (CTAPS), eingesetzt wird.
4. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zum Verdünnen der lysierten Probe von Patientenmaterial vor der Filtration eine Elektrolyt-Lösung, z. B. Ringerlösung, verwendet wird.
5. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Lyse- und Filtrationsprozedur die Vitalität und damit den kulturellen Nachweis der abzufiltrierenden Mikroorganismen nicht beeinträchtigt.
6. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mikroskopisch betrachtbare Filter, z. B. Polycarbonat-Membranen Durchmesser 13 mm, verwendet werden.
7. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß während der Filtration unter dem Filtermedium eine perforierte Unterstützungslochplatte liegt, welche auf dem Filtermedium eine rasterartige Orientierungshilfe erzeugt.
8. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß im Anschluß an die Filtration eine Anfärbung der abfiltrierten Mikroorganismen erfolgt, beispielsweise zum erleichterten Auffinden der Mikroorganismen bei mikroskopischer Betrachtung des Filters unter Aufsicht-Fluoreszenz.
9. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die abfiltrierten Mikroorganismen auf dem Filter mikroskopisch, molekularbiologisch, und/oder kulturell nachgewiesen bzw. identifiziert werden können.
10. Vorrichtung nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Filtrationsdruck manuell, mit mechanischen Hilfsmitteln, mittels Zentrifugation, mittels Unter-/Überdruck oder osmotisch erzeugt wird und somit die Filtration der lysierten zell-



- Mikroskopie
- PCR / LCR
- Filter Hybridisierung
- Kulturelle Anzucht
- Gaschromatographische oder konventionelle Speziesbestimmung
- Resistenz-Testung